

# 研究報文

## 転写現象の方程式

野々垣 智美, 森瀬 美由紀, 近藤 芙美, 須田 温子,  
長尾 香奈, 長谷川 千幸, 廣瀬 友紀, 藤井 愛美, 宮田 堅司

### Equation for Transcription

Tomomi Nonogaki, Miyuki Morise, Fumi Kondou, Atsuko Suda,  
Kana Nagao, Chiyuki Hasegawa, Yuki Hirose, Megumi Fujii and Kenji Miyata

#### Summary

The ratio of some gene-transcripts in the thymus of mouse had a maximum with aging. A second order differential equation,  $\ddot{x} + 2a\dot{x} + bx = bD$ , could be used to analyze such measurements. This equation resembled one used in a damped harmonic oscillator, then, it was supposed that the quantities of transcripts increased and decreased repeatedly in time-course under the influence of some factors. The general solution of above-mentioned differential equation took the form  $x = Ce^{-at} \cos(\sqrt{b-a^2}t + \beta) + D$  in the case of  $b - a^2 > 0$  or  $x = Ae^{-(a+\sqrt{a^2-b})t} + Be^{-(a-\sqrt{a^2-b})t} + D$  in  $b - a^2 < 0$ .

The ratios of interleukin2(IL2),4(IL4), T cell receptor  $\beta$ -chain(TCR $\beta$ ), immunoglobulin E(IgE) and M(IgM)-transcripts were measured in the thymus of mice by realtime PCR. LogIL4/TCR $\beta$  and logIgE/IgM increased rapidly from birth to about 50 days and then decreased, namely had maximums. Otherwise, logIL2/TCR $\beta$  increased slightly after birth and remained constantly. The calculated values by the equation using adequate parameters were in fair agreement with those measured.

(Received September 8, 2011)

## I. はじめに

組織内で特定の遺伝子の転写量を測定することは困難であるけれども、抽出したRNA中に含まれる2種類の遺伝子転写産物量を比較することは可能である。リアルタイムPCR法では、容易に2種の遺伝子転写産物量比を求めることが可能であり、その値の経時変化は時間に対して単調に変化する場合が多い<sup>1), 2)</sup>。また、脂肪細胞やBリンパ球で、細胞の分化度により転写される様になる遺伝子間の転写量比の場合には、細胞が分化する駆動力は細胞濃度であると考えることにより、その経時変化を分化過程の速度式で解析できることを明らかにしてき

た<sup>1), 2)</sup>。しかし、マウス胸腺におけるIgEのIgMに対する転写量比の加齢変化には極大値が存在し、このような経時変化を速度論で説明することはできなかった<sup>3)</sup>。

本報では、マウス胸腺での、インターロイキン2(IL2)および4(IL4)のT細胞受容体 $\beta$ 鎖(TCR $\beta$ )に対する転写量比の加齢変化をリアルタイムPCR法により測定し、IL4の場合には極大値が検出されることを明らかにした。また、極大値が存在する場合の解析方法を検討した。

## II. 方法

コンベンショナルな条件下で飼育したBALB/c雌マウスを用いた。組織の抽出、トータルRNAの抽出、逆転写反応およびリアルタイムPCRは前報

と同様に行った<sup>1), 2), 3)</sup>。PCR反応に用いたプライマーを表1に示した。プライマーは、少なくとも一つのイントロン領域を間に含むエクソン領域に相補的に結合するように設定した。これらのプライマーにより、*IL2*、*IL4*、および*TCRβ*ともに110塩基対のDNAフラグメントが増幅される。得られた増幅曲線より、蛍光強度が一定値(相対強度40)に達するまでに要したPCRのサイクル数 $n$ を読み取った。例えば、試料溶液中に存在した*TCRβ*と*IL2*とのコピー数比の常用対数値 $\log \frac{IL2}{TCR\beta}$ は①式で求めた<sup>1), 2), 3)</sup>。

$$\log \frac{IL2}{TCR\beta} = (n_{TCR\beta} - n_{IL2}) \log 2 \quad \cdots \textcircled{1}$$

ここで、 $n_{TCR\beta}$  および  $n_{IL2}$  は *TCRβ* および *IL2* の増幅曲線が蛍光強度40に達するに要したサイクル数である。

	For.	Rev.
IL2	GCTTTCAATTGGAAGATGCT	TGCTGACTCATCATCGAATT
IL4	ATGTGCCAAACGTCCTCACA	GCATGGAGTTTTCCTCATGTT
TCR β	ACCCAAACCTGTGCACACAGA	CATAGAGGATGGTTGCAGAC
IgM	ACGTGTCCTCCACATGTGCT	ACAGGTCAGGTTAGCGGACT
IgE	AAGAACTTCACATGCCACGT	GATGAATGGAGTAGCTCCA

表1 PCR反応にもちいたプライマー

これらのプライマーは、少なくとも一つのイントロン領域を間に含むエクソン領域に相補的に結合するように設定した。いずれの場合にも110塩基対のDNA鎖が増幅される。

### III. 理論

2種の遺伝子の転写量比の常用対数値は①式で求める。この値の経時変化に極大値が存在する場合には、転写速度が大きく変化することを示唆しているので速度の時間変化項も考慮し、濃度変化の速度項の他に加速度項および濃度依存項を含む微分方程式②を考える。

$$\ddot{x} + 2a\dot{x} + bx = bD \quad \cdots \textcircled{2}$$

ここで、 $a$ 、 $b$ および $D$ は定数であり、 $x$ が転写量比の対数値を表す。これは減衰振動現象を表す方程式に類似している<sup>4)</sup>。すなわち、転写量比 $x$ が、したがって転写量が経時的に増減すると考えることにより、②式を適用することが可能である。②式の実数の一般解は、

$$b - a^2 > 0 \text{ の場合,}$$

$$x = Ce^{-at} \cos(\sqrt{b - a^2} t + \beta) + D \quad \cdots \textcircled{3}$$

$$b - a^2 < 0 \text{ の場合,}$$

$$x = Ae^{-(a + \sqrt{a^2 - b})t} + Be^{-(a - \sqrt{a^2 - b})t} + D \quad \cdots \textcircled{4}$$

となる。ここで、 $A$ 、 $B$ 、 $C$ および $D$ は任意の定数、 $\beta$ は初期位相を表す。③式は経時的に振幅が減少しながら角振動数 $\sqrt{b - a^2}$ で振動し、時間 $t$ が大きい領域で一定値 $D$ に収束する減衰振動を表す。④式は経時的に単調に増加あるいは減少し、時間 $t$ が大きい領域で $D$ に漸近する過減衰曲線となり、この場合には速度論で得られる曲線と類似する。

### IV. 結果および考察

①式より求めた*IL2*の*TCRβ*に対する転写量比の加齢変化 $\log \frac{IL2}{TCR\beta}$ を図1に示した。転写量比 $\log \frac{IL2}{TCR\beta}$ は出生後加齢に伴い僅かに増大する傾向が認められた。また、適当なパラメーターの値を用いて④式により計算した曲線も図1に示した。

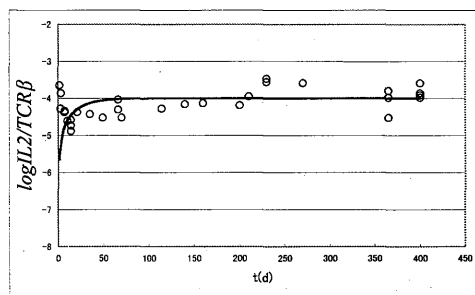
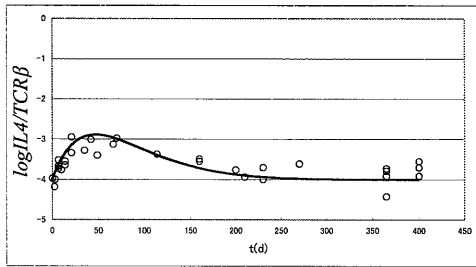


図1  $\log \frac{IL2}{TCR\beta}$  の加齢変化

$\log \frac{IL2}{TCR\beta}$  の値は加齢に伴い僅かに増大する傾向を示した。④式により  $a = 0.2$ 、 $b = 0.02$ 、 $A = -1$ 、 $B = -1$  および  $D = -4$  として計算した曲線も示した。7週齢以降一定となり実験値と一致した。

*IL4*の*TCRβ*に対する転写量比の加齢変化 $\log \frac{IL4}{TCR\beta}$ を図2に示した。転写量比 $\log \frac{IL4}{TCR\beta}$ は生後急激に増大し7週齢前後で極大となり、その後緩やかに減少し、およそ30週齢で一定値となった。適当なパラメーターの値を用いて③式により計算した曲線も図2に示した。計算に用いたパラメーターと物理化学的な定数の関連性は不明であるけれども、*IL2*および*IL4*の場合ともに、その経時変化を説明するのに②式を適用できることが明らかとなった。用いたパラメーターの値を表2に示した。

マウス胸腺での*IgE*の*IgM*に対する転写量比 $\log \frac{IgE}{IgM}$ の加齢変化にも極大値が存在することを示した<sup>が<sup>3)</sup></sup>、この結果も③式により説明可能なはずである。

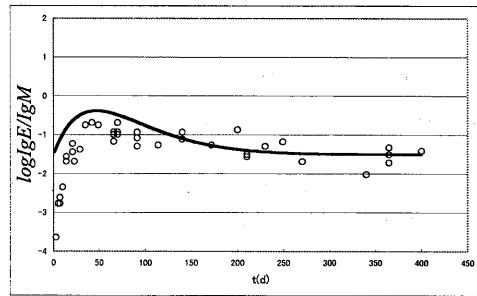
図 2  $\log \frac{IL4}{TCR\beta}$  の加齢変化

$\log \frac{IL4}{TCR\beta}$  の値は生後急激に増大し 7 週齢前後で極大となり、その後緩やかに低下しおよそ 30 週齢以降一定となった。③式により  $a=0.02$ ,  $b=0.00048$ ,  $C=-7$ ,  $D=-4$  および  $\beta=\frac{\pi}{2}$  として計算した曲線も示した。実験値と良く一致した。

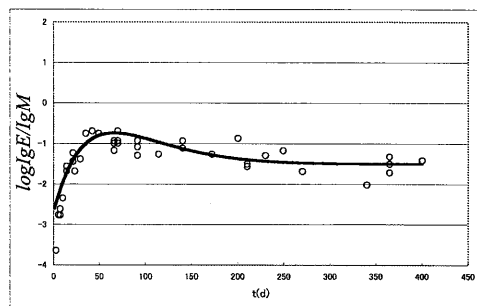
$\log \frac{IL2}{TCR\beta}$	$a=0.2$ $b=0.02$ $A=-1$ $B=-1$ $D=-4$
$\log \frac{IL4}{TCR\beta}$	$a=0.02$ $b=0.00048$ $C=-7$ $D=-4$ $\beta=\pi/2$
$\log \frac{IgE}{IgM}$ (図 3)	$a=0.02$ $b=0.00048$ $C=-7$ $D=-1.5$ $\beta=\pi/2$
$\log \frac{IgE}{IgM}$ (図 4)	$a=0.02$ $b=0.00048$ $C=-7$ $D=-1.5$ $\beta=\pi/2.2$

表 2. ③あるいは④式での計算に用いたパラメーターの値

$IL4$  は B リンパ球の活性化および分化因子であり、過剰な場合には  $IgE$  産生を促進しアレルギー傾向を付与することが知られている<sup>5)</sup>。転写現象を振動論で取り扱うことの妥当性を調べるために、マウス胸腺での  $IL4$  と  $IgE$  転写量の関連性を検討した。③式により  $\log \frac{IgE}{IgM}$  を計算する際に、 $\log \frac{IL4}{TCR\beta}$  を計算した場合に用いたのと同じパラメーターを用いて計算した結果を図 3 に示した。ただし、 $t$  が十分大きい領域での値を表す  $D$  の値は  $-1.5$  とした。この計算結果は測定値と一致しなかった。そこで初期位相  $\beta$  だけを  $\frac{\pi}{2}$  から  $\frac{\pi}{2.2}$  に代えて③式により計算すると測定値と良く一致した (図 4)。このことは、マウス胸腺内でも  $IL4$  が  $IgE$  転写の誘導に関与していることを示唆しており、 $IL4$  が転写、翻訳、分泌され、B リンパ球に作用し  $IgE$  の転写を開始させるのに  $(\frac{\pi}{2} - \frac{\pi}{2.2})$  日、すなわちおよそ 3.4 時間必要なことを示している。初期位相を代えるだけで、 $IL4$  の場合に用いたパラメーターと同一のパラメーターの値で  $IgE$  転写の経時変化を説明できることは、②の方

図 3  $\log \frac{IgE}{IgM}$  の加齢変化

$\log \frac{IgE}{IgM}$  の値は生後急激に増大し 7 週齢前後で極大となり、その後緩やかに低下した。 $IL4$  の  $IgE$  誘導効果を検討するために、 $\log \frac{IgE}{IgM}$  の計算値を求めるのに用いたパラメーター、 $a=0.02$ ,  $b=0.00048$ ,  $C=-7$ ,  $D=-1.5$  および  $\beta=\frac{\pi}{2}$  として③式により計算した曲線も示した。生後から極大値、さらに 100 日齢付近までの実験値との間に乖離が認められた。

図 4  $\log \frac{IgE}{IgM}$  の加齢変化

初期位相  $\beta$  の値だけを小さくし  $\frac{\pi}{2.2}$  として③式により計算すると、実験値と良く一致した。

程式が生体内での転写量を解析するのに適用できることを示している。今回の結果は、転写量が増減するとみなすことにより得られたものであり、したがって、転写現象に留まらず、生体内で経時的に増減するもの、たとえば、特定のタンパク質量や分泌ホルモン量などの経時変化も振動現象として取り扱うことが可能であろう。

## 文献

- 1) 清水里枝, 竹内亜里沙, 田中麻由里, 玉井千晶, 中西美貴, 西尾依里奈, 二田智恵子, 宮崎木綿子, 山口文乃, 宮田堅司: 本誌, **64**, 11 (2009)
- 2) 犬竹真奈美, 梶谷奈央, 高橋知実, 富永佳央理,

- 仲林祐衣, 藤本真代, 山戸美幸, 宮田堅司: 本誌, **63**, 1 (2008)
- 3) 宮田堅司: 本誌, **66**, 1 (2011)
- 4) 星崎憲夫, 町田茂: 基幹物理学 第 2 版 (てらぺいあ), 254 (2009)
- 5) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male: *Immunology*, 5th ed. (Mosby), 149 (1998)